

백서의 대뇌에 이식한 신경아세포의 분화과정

연세대학교 의과대학 신경외과학교실

윤 영 설

Differentiation of Neuronal Stem Cells Implanted into Brain of Rat

Young Sul Yoon, MD

Department of Neurosurgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

포유류의 중추신경계를 구성하고 있는 신경세포와 별아교세포(astrocytes) 및 희소돌기아교세포(oligodendrocytes) 등은 발생초기 ventricular zone의 neuroepithelium에서 유래한다.¹¹⁾ 이 neuroepithelial cell은 neuronal precursor cell과 glial precursor cell로 분화가 되며, glial precursor cell은 다시 radial glial cell과 type IA progenitor cell 그리고 O-2A progenitor cell로 분화가 된다.⁵⁾ Radial glial cell은 ventricular zone에서 pia matter까지 process가 뻗어 있는데, 발생초기에 신경세포는 이 radial glial cell과 접촉하면서 이동하게 된다.²⁾ 신경세포의 이동이 끝난 후에 이 radial glial cell은 ependymal cell이나 tanycytes, Muller cell, Bergmann cell등으로 분화가 되는 것으로 알려졌다.⁵⁾ Type IA progenitor cell은 radial glial cell 주위에 있으면서 신경세포와 접촉이 없었던 세포를 뜻하며 이 세포는 type I 아교세포로 분화되는 것으로 보고되었다.⁸⁾ O-2A progenitor cell은 흰쥐 시신경에서 처음 그 존재가 알려졌다.²⁵⁾ 배양 조건에 따라 희소돌기아교세포 또는 type II 아교세포로 분화가 일어나는 것으로 보고되었다.²⁰⁾ 즉 이 세포가 혈청이 포함되지 않은 배양액에서는 희소돌기아교세포로 분화되며, 혈청이 포함된 배양액에서는 type II 아교세포로 분화가 일어난다. 이 O-2A progenitor cell은

대뇌³⁾와 소뇌에서도¹⁾ 그 존재가 증명되었다. Type I 아교세포와 type II 아교세포는 배양된 세포에 사용하는 용어이며 생체 내에서는 protoplasmic 아교세포와 fibrous 아교세포라는 용어를 사용하는데,¹¹⁾ type I 및 type II 아교세포가 각기 protoplasmic 아교세포 및 fibrous 아교세포와 구조 및 기능 면에서 유사한 점이 보고되었으나¹⁶⁾³⁴⁾ 그 구조와 기능이 일치하지는 않는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾

분화과정 중이거나 분화된 glial cell에 대한 marker로 사용되는 항체는 많이 보고되었고, 또 분화된 신경세포에서도 neuron-specific enolase(NSE)²⁷⁾나 neurofilament에 대한 항체,²³⁾ 또는 r-aminobutyric acid(GABA)나 serotonin, substance P 등 neurotransmitter 들에 대한 항체도 많이 보고되었다.⁴⁾⁵⁾ 한편 epidermal growth factor(EGF)를 이용하여 한 종류의 progenitor cell로부터 신경세포와 희소돌기아교세포 및 별아교세포가 모두 분화되는 것을 보고된바 있다.³⁵⁾³⁶⁾

따라서 본 연구에서는 EGF를 이용하여 progenitor cell을 7일간 배양한 후, 이 세포의 특징을 분석하였고 또한 분화가 끝난 조직 내로 cell들을 이식하였을 때, 중추신경계의 신경세포로 분화과정의 특징을 밝혀 내었다.

연구 방법

신경간세포의 일차 배양

신경간세포의 일차배양은 Peynolds 및 Weiss의 방법을 응용하여 시행했다. 임신 후 15일 된 후의 흰쥐의 자궁으로부터 약 12~15마리의 fetus를 적출한 후, 머리를 절단하고 두개골을 제거 후, 대뇌를 Ca^{2+}/Mg^{2+} free Hanks'

Address for correspondence: Young Sul Yoon, MD, Department of Neurosurgery, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2019-3394, Fax: +82-2-3465-9229

E-mail: ysyoon@yumc.yonsei.ac.kr

This study was supported by a faculty research grant of Yonsei University College of Medicine for 2001.

balanced salts solution(HBSS, Gibco, Grand island, NY, USA)에 넣었다. Clean bench 내의 수술 현미경 하에서 뇌막을 완전히 제거한 후 이를 10ml 파이펫을 이용하여 조직 분쇄하였다. 세포를 분리하기 위해 trypsin을 0.13% 되도록 첨가한 후 37℃에서 15분간 incubation 하였다. Incubation이 끝난 다음 이를 Nitex filter(Tetko, Elmsford, NY, USA) #210 및 #130에 통과시키고, 통과된 세포는 3,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. Trypsin을 제거하기 위해 세포 침전물을 신선한 HBSS에 재부유시키고, 이를 다시 Nitex filter #130에 통과시킨 다음 원심분리하였다. 최종적인 세포 부유액을 얻기 위해 이 세포 침전물을 EGF가 포함된 무혈청 배양액(serum-free medium, SFM)에 재부유시켜 Nitex filter #40에 통과시켰다. 이렇게 얻은 세포 부유액의 세포 수는 hemocytometer를 이용하여 측정하고 6-well 배양판에 2.5×10^5 cells/ml의 농도로 1ml씩 plate하여 배양하였다. 배양 5~7일이 경과한 다음 배양액에 떠 있는 신경간세포 세포군(cell clusters)을 위상차 현미경으로 확인했다. SFM은 5mM hydrocortisone(Sigma, St Louis, MO, USA), 100 μ M putrescine(Sigma), 30nM selenium(Sigma), 20 μ g/ml transferrin(Sigma), 10 μ g/ml insulin(Sigma), 20ng/ml EGF(Sigma)와 5mM HEPES(Sigma)를 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco) 용액으로 조성하였다.

신경세포와 신경간세포에서 분화된 신경세포의 특성 연구

배양액에 부유하고 있는 세포군이 신경간세포로 구성되어 있음을 증명하기 위해 다음과 같은 실험을 하였다. 이 세포군을 poly-L-lysine(PLL)으로 처리된 chambered 슬라이드에 재분주하고 7일 후 면역화학염색 방법으로 확인하였다. 신경세포와 별아교세포 및 희소돌기아교세포가 신경간세포로부터 분화되는 것은 일차배양된 신경간세포 세포군을 PLL로 처리된 chambered slide에서 7일간 EGF가 포함되지 않는 SFM으로 이차 배양한 후 tau, GFAP 및 GC에 대한 면역화학염색으로 확인한다. 또한 신경간세포로부터 분화된 신경세포의 특성 연구를 위해 이차 배양 7일 후 tyrosine hydroxylase 및 중요 신경전달물질인 GABA, substance P, serotonin 등을 신경간세포로부터 분화된 신경세포가 함유하고 있는지 면역화학 염색으로 확인한다.

신경아세포의 이식

6 well 배양판에서 5~7일간 배양된 신경아세포의 배지 내로 Bromodeoxyuridine(BrdU)을 50 μ M이 되게 집어 넣은 후 하루 동안 배양 시켰다. 이를 다음날 trypsin을 이용하여 떼어내고 50ml 원심분리관에 모은 후, 이를 3,000 rpm에서 원심분리하고 상층액을 버린 다음 40ml의 EGF가 포함된 SFM을 넣고 원심분리 세척한다.

Fig. 1에서와 같은 장치 하에서 저속의 micro-injector를 사용하여 cell을 뇌조직 속으로 주사하였다. 주사 후 주사기를 뺄 시에는 cell의 확산을 방지하기 위하여 cell 주사 10분 후에 제거 하였다.

신경아세포가 이식된 생쥐 대뇌의 분리, 고정, 표본 제작 및 면역조직화학 염색

6-OHDA Lesion은 halotane을 사용하여 마취를 하여 시행하였다. 우선 6-OHDA solution(2mg/ml) 4ml을 왼쪽 substantia nigra(SN, 2mm anterior to interaural line ; 1.6mm lateral to the midline, and 7.2mm below the dura)로 4분에 걸쳐서 주사하였고, 주사기를 제거할 때에는 6-OHDA의 역류를 방지하기 위하여 5분 후에 제거 하였다. 이렇게 만들어진 model은 10일 후 미리 준비되어진 세포를 이식하는데 사용하였다. 세포를 이식 받은 1주일 후 이식된 세포의 이식 성공을 확인하기 위하여 TH에 대한 면역 조직화학 염색을 실행하였다. 이를 위해 먼저 흰쥐를 ketamine으로 마취시키고 xiphoid process 아래 복부와 횡경막을 복부와 횡경막을 절제한 후 심장을 노

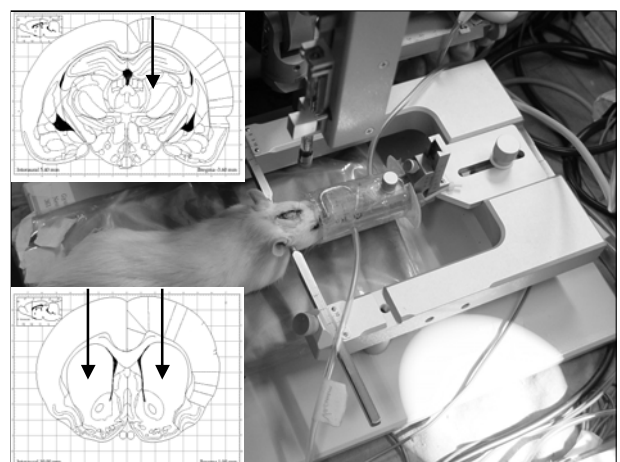


Fig. 1. The transplantation of cells using a stereotaxic method. Blue arrow indicates the area of transplant.

출한 후, 심장 침부로부터 대동맥까지 18G 주사바늘을 이용하여 도관을 삽입하였다. 50mM phosphate로 완충된 생리식염수(pH 7.4)를 perfusion pump를 이용하여 분 당 20ml씩 관류시킨 다음, 4 % paraformaldehyde를 포함한 PBS를 분당 15ml씩 관류시켜 흰쥐 대뇌를 고정하였다. 고정과정이 끝난 흰쥐 대뇌를 분리한 다음 뇌막을 제거하고 이를 vibratome을 이용하여 30 μ m 두께의 조직 절편을 만든다. 조직 표본을 gelatin이 표면처리된 유리 슬라이드에 부착시키고 이를 0.2% Triton X-100을 포함한 PBS에 4℃에서 20분간 노출시켜 세포막에 작은 구멍을 만든다. 이 표본을 30℃에서 30분간 10% 우태아 혈청이 포함된 PBS용액에 incubation하여 비특이적 항원을 차단한 후 면역 조직화학적 염색을 시행하였다.

결 과

신경아세포의 일차 배양

흰쥐 대뇌 세포를 EGF를 포함한 SFM으로 배양했을 때 배양 1~2일에 대부분의 세포는 사멸하였지만 일부 세포는 증식이 일어났다. 이 세포들은 위상차 현미경하에서 둥글고 밝게 빛나는 모양으로 관찰 되었다. 이 세포들은 군집을 이루면서 증식하였는데 이 세포군은 배양액 내에서 부유상태로 존재하였다. 일차 배양된 이 세포들의 특성을 연

구하기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다. 즉 세포군들을 poly-L-lysine으로 처리된 Lab-Tek 슬라이드에 replated 한 다음 일주일 후 세포를 고정시키고 세포들의 특성을 구별하기 위하여 NeuN, GFAP, tyrosine hydroxylase (TH)에 대한 면역화학반응을 확인한 결과 NeuN과 TH에는 양성 반응을 보였으나 GFAP에는 음성의 반응을 보였다. 이 결과를 볼 때 EGF를 처리한 SFM상에서 자라는 neuroprogenitor cell들은 주로 dopamine을 생성하는 신경세포로 분화되는 것을 확인할 수 있었다.

신경아세포의 분화과정 및 신경아세포에서 유래된 신경세포의 특성

신경아세포의 분화과정을 보기 위해 PLL으로 처리된 Lab-Tek 슬라이드에서 신경아세포를 2주간 EGF를 포함한 SFM으로 이차 배양하였다. 이차 배양 전기간을 통하여 이 세포들은 계속 증식 및 이동하여 이웃한 세포군과 만나게 되는 경우는 더 이상의 세포 이동 없이 증식만 일어났는데, 이때는 기존 세포층 위로 증식이 일어나는 양상을 보였다. 배양 3일부터 일부 세포에서 간혹 GFAP를 발현 하였으나 대부분의 세포들은 cluster를 중심으로 신경 세포에서 특이적으로 발현되는 NeuN이 발현되었다. 또한 Dopaminergic neuron의 maker인 TH를 사용 면역 염색을 한 결과 대부분의 세포들이 양성반응을 보임을 관찰할 수 있

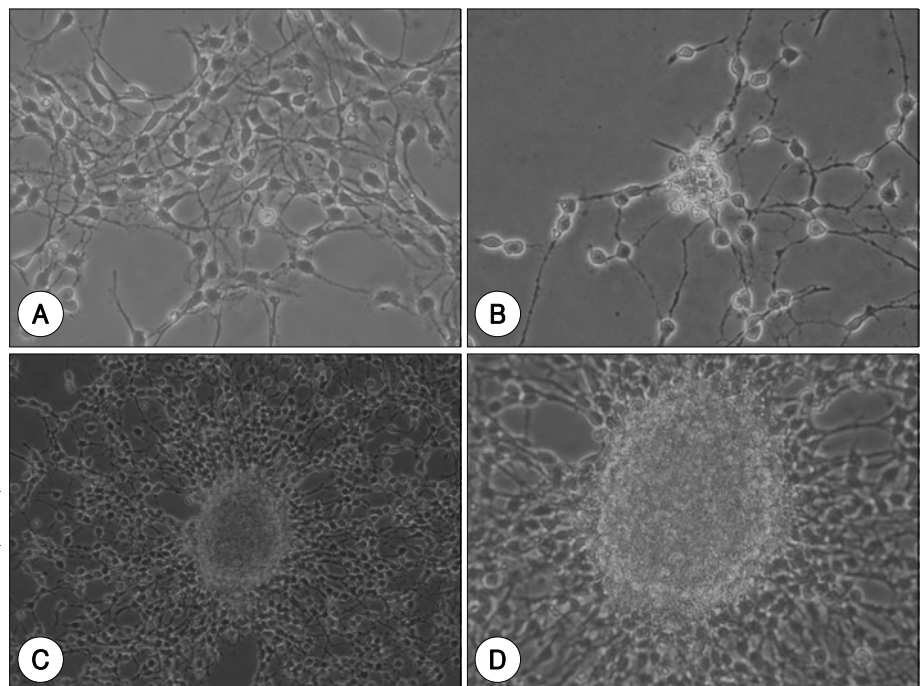


Fig. 2. The morphology of neuroblasts after the secondary culture. A : General morphology of cultured cells ($\times 200$). They showed a bipolar shape. B : Clusters appeared from 3days of the secondary culture ($\times 200$). Cells proliferated continuously in the center of clusters as shown in B. C : Proliferating clusters on the 7th day of the secondary culture ($\times 200$). D : Proliferating clusters on the 7th day of the secondary culture ($\times 400$).

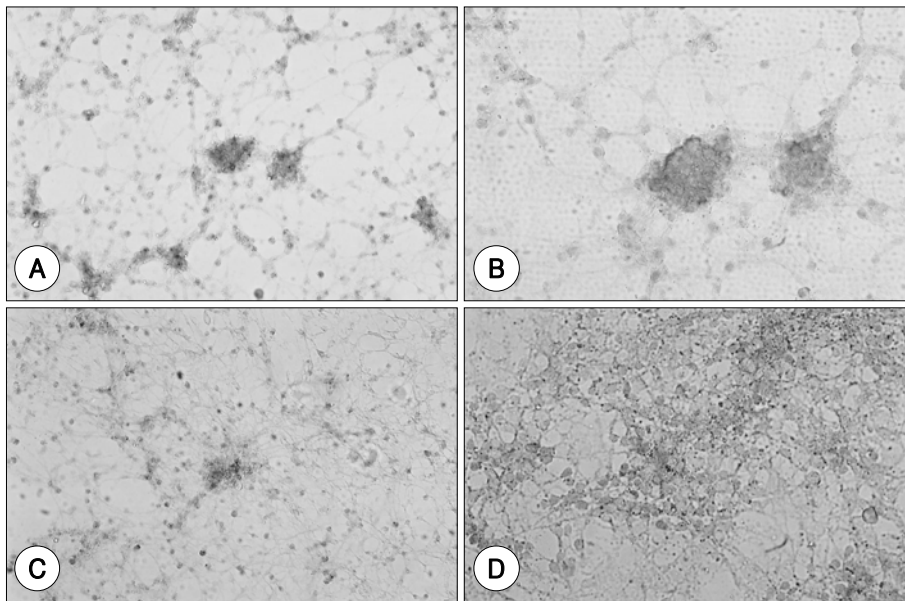


Fig. 3. Immunohistochemical staining of neuroblasts against Neon and TH on the 7th day of the secondary culture. A : Cells positive for Neon in immunohistochemical staining ($\times 200$). Cells in the periphery of cluster were strongly positive ; however, after 7days of culture, the result of immune reaction showed that over 90% cells were positive. B : Cells positive in immunohistochemical staining for Neon ($\times 400$). C : Cells positive in immunohistochemical staining for TH ($\times 200$). D : Cells positive in immunohistochemical staining for TH ($\times 400$).

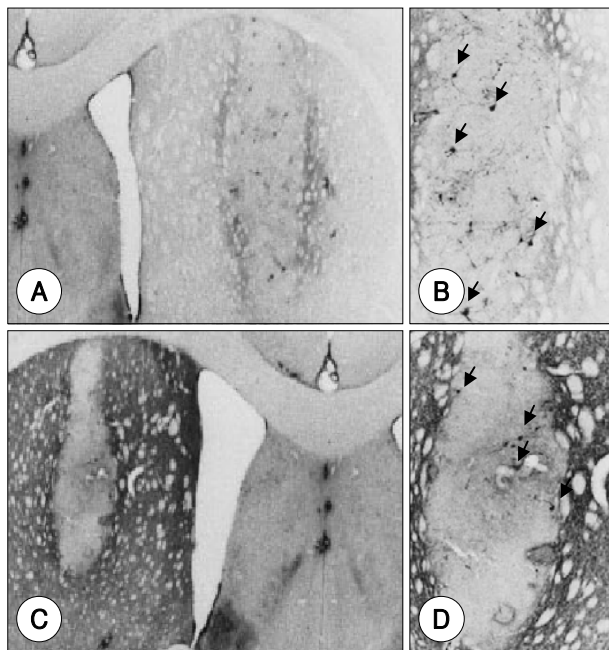


Fig. 4. Immunostaining of neuroblasts transplanted to the striatum. A : The area affected by 6-OHDA. B : Cells positive for TH among cells transplanted to the area affected by 6-OHDA. C : The area unaffected by 6-OHDA. D : Cells positive for TH in the area unaffected by 6-OHDA.

었다(Figs. 2 and 3).

이식된 신경아세포의 도파민 세포로의 분화

6-OHDA Lesion 후 1주일에 신경아세포를 이식하였다. 이식 후 다시 1주일 후에 조직으로 부터 면역염색을

실시한 결과 Fig. 4와 같이 이식된 부위 모두에서 미약하나마 면역염색 양성반응을 관찰 할 수 있었다.

본 연구에서는 세포군 형태로 세포를 이식하였기 때문에 이식한 정확한 세포수를 측정하지는 못하였으나, 대략 $107 \sim 108 \text{ 개/ml} \times 3 \mu\text{l}$, 즉 30,000~300,000개의 세포로 추정된다. 그러나 극히 일부의 세포만 착상되었고, 대부분의 세포는 상처부위로 역류 또는 착상되지 못하고 죽었을 것으로 생각된다.

고 찰

최근 Cameron 및 Rakic⁵⁾은 한 종류의 신경상피세포로부터 신경세포와 아교세포가 분화될 것이라는 가설을 보고한 바 있으며, Reynolds와 Weiss²⁸⁾은 성숙된 흰쥐의 대뇌 선조체와 신생 흰쥐 대뇌에서 신경상피세포의 존재를 증명한 바 있다. 성숙된 흰쥐 대뇌에 존재하는 신경상피세포와 태아 흰쥐 대뇌에 존재하는 신경상피세포와 특성이 일치하는지에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 않았다. 그러나 성숙된 흰쥐 대뇌와 태아 흰쥐 대뇌에 있는 신경상피세포가 bFGF 및 EGF에 의해 증식되는 양상이 다른 것 등 세포 계열이 다른 신경상피세포가 존재할 가능성이 보고된 바 있다. 본 실험에서는 EGF를 포함한 무혈청 배양액을 이용하여 태아 흰쥐 대뇌에 있는 신경상피세포로부터 신경세포를 분화시킬 수 있었다.

신경상피세포로부터 신경세포와 별아교세포 및 희소돌

기 아교세포의 분화율은 배양액 내에 포함되는 cytokine의 종류에 영향을 받는 것으로 알려졌다. 즉 EGF로 배양된 신경상피세포는 platelet-derived growth factor(PDGF)에 의해 신경상피세포로부터 신경세포로의 분화율이 증가되며, ciliary neurotrophic factor(CNTF) 및 triiodo thyronin(T3)에 의해서는 각기 신경상피세포로부터 별아교세포 및 희소돌기아교세포로의 분화율이 증가된다.

신경세포의 분화과정에는 위에서 기술한 cytokine이나 호르몬 외에도 세포간의 접촉이 관여하는 것으로 알려졌다. 예를 들어 신경이 절단되어 acetylcholine 또는 영양인자의 근육으로의 전달이 차단되면 그 신경이 지배하고 있는 근육이 퇴화되며, 또 실험적으로 근육을 제거하면 그 근육을 지배하는 운동신경의 퇴화가 오는데 이는 근육에서도 신경의 분화 및 성장에 영향을 주는 신경 영양인자(neurotrophic factor)가 생성되기 때문인 것으로 알려졌다. 중추 신경계에 있는 신경세포는 별아교 세포와 접촉하고 있는데 별아교세포는 신경세포에서 분비되는 신경전달물질을 섭취하기도 하며 또 여러 cytokine이나 신경영양물질을 신경세포로 분비하여 신경세포의 생존율과 분화에 영향을 준다.

신경세포의 분화과정에는 그 밖에도 세포의 기질이 관여하는 것으로 알려졌다. 즉 발생기 시 신경세포는 방사아교세포(radial glial cell)의 세포외기질에 부착하여 이동되면서 분화가 일어나는 것으로 보고 되었다.

중추 신경계의 손상이나 질환이 없는 상태에 신경세포를 이식하면 이식된 신경세포는 착상이 이루어지지 않으며, 단지 중추신경계 손상 및 질환이 있는 경우 또는 유아기의 중추신경계에 이식했을 때만 착상이 일어난다. 이는 아직 그 기전은 밝혀지지 않았지만 뇌손상을 받은 후 또는 유아기 중추신경계 내에는 이식된 신경세포의 착상 및 생존에 적합한 환경이 조성되었기 때문일 것으로 믿고 있다. 본 실험에서는 이식된 신경간세포의 수는 30,000~300,000개 내외이며, 실제 이식 1주일 후 살아 있는 세포의 수는 30~100개 정도로 생존율은 0.1% 미만이었다. 이는 발암 유전자를 transfection한 신경간 세포의 생존율 최고 20~30, 그리고 일차 배양된 신경세포를 이식했을 때의 생존율 0.5~5%보다도 낮는데 그 이유는 다음의 몇 가지 기전인 단독 또는 복합적으로 작용했기 때문일 것으로 생각된다.

첫째, 신경간세포는 신경세포보다 외부자극에 더 취약하기 때문이다. 일차배양된 신경간세포는 신경세포보다 저산소증이나 pH감소 등에 더 민감한 것으로 알려졌다.

둘째, 신경간세포가 혈액에 노출되었기 때문일 가능성이 있다. 신경간세포를 일차배양할 때 배양액에 혈청을 1% 정도 포함시키면 신경간세포의 생존율이 매우 감소하며 배양 2주 쯤에는 분화된 신경세포가 모두 사멸하는 것으로 알려졌다. 따라서 이식 과정에서 신경간세포가 혈액에 노출되어 생존율이 낮아졌을 가능성이 있다. 셋째, 이식 후에는 배양때와는 달리 EGF를 포함한 신경간세포의 증식을 지지해 주는 요인이 없어지기 때문에 생존율이 낮아졌을 가능성도 배제할 수는 없을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 EGF가 포함된 SFM상에서 7일간 배양 후 신경아세포가 dopaminergic neuron으로 분화함을 보여주었고, 또한 이렇게 배양된 세포를 parkinson's disease가 일어난 흰쥐의 대뇌에 이식 하였을 시에 dopaminergic neuron으로 성공적인 분화가 일어난다는 것을 확인 하였다.

하지만 이번 실험의 결과가 EGF와 SFM가 신경아세포가 dopaminergic neuron으로 어떻게 분화를 일으키는지 정확한 메커니즘은 밝히지 못했지만 적, 간접적인 영향을 주는 것임을 입증 하였다. 앞으로의 이러한 조성이 세포 내에서 어떠한 메커니즘을 유도하여 dopaminergic neuron으로 분화가 되는지를 분자생물학적인 연구가 더 진행되어야 하겠다. 또한 더욱 안정적인 이식환경을 만들어 이상적인 cytototherapy에 응용에 더 많은 연구가 진행되어야 하겠다.

결 론

Fetal rat의 대뇌에 존재하는 신경간세포를 일차배양하여 이 신경간 세포의 특성 연구를 하였으며, 이 신경간세포를 6-OHDA로 parkinsonism을 일으킨 흰쥐 대뇌의 striatum에 이식하여 생체 내에서의 분화과정을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) EGF를 포함한 무혈청 배양액으로 신경간세포를 배양했을 때 신경간세포로부터 신경세포를 유도하였다.

2) 이때 분화된 신경세포 중 일부는 tyrosine hydroxylase 포함 세포로 유도 되었다.

3) Parkinsonism이 유발된 흰쥐의 대뇌 striatum에 신경간세포를 이식했을 때 이식 7일 후 일부세포가 TH 함유 신경세포로 분화된 것을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과로 생체 외에서 신경간세포로부터 분화된 신경세포는 TH함유 세포로 분화할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Aloisi F, Agresti C, D'urso D, Levi G: *Differentiation of bipotential glial precursors into oligodendrocytes is promoted by interaction with type I astrocytes in cerebellar cultures.* *Proc Natl Acad Sci* 85:6167-6171, 1988
2. Anton ES, Marchionni MA, Lee KF, Rakic P: *Role of GGF/neuroregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex.* *Development* 124 (18):3501-3510, 1997
3. Behar T, McMorris FA, Novotny EA: *Growth and differentiation properties of O-2A progenitors purified from rat cerebral hemispheres.* *J Neurosci Res* 21:168-180, 1988
4. Calof AL, Reichardt LF: *Motoneurons purified by cell sorting respond to two distinct activities in myotube-conditioned medium.* *Dev Biol* 106 (1):194-210, 1984
5. Cameron RS, Rakic P: *Glial cell lineage in the cerebral cortex cells.* *Glia* 4:124-137, 1991
6. Carrano JA, Eagleson KL, Armson PF: *Production of monoclonal antibodies against developmental antigens on motor neurons and retinal ganglion cells.* *Neurosci Lett Suppl* 9:549, 1985
7. Cattaneo E, McKay R: *Identifying and manipulating neuronal stem cells.* *Trends In Neurosci* 14:338-340, 1991
8. Franklin RJ, Bayley SA, Milner R, French-Constant C, Blake-more WF: *Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia-deficient areas of CNS white matter.* *Glia* 13 (1):39-44, 1995
9. Frederolsen K, McKay RD: *Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo.* *J Neurosci* 8 (4):1144-1151, 1988
10. Hansson E: *Brain primary cultures and vibrodissociated cells as tools for the study of astroglial properties and functions.* [Review] *Dev Neurosci* 21 (1):1-11, 1999
11. Jacobson M: *In Developmental Neurobiology* 3rd ed. New York: Plenum press, 1991, pp311-358
12. Kobayashi K, Yoshida M, Shinoda Y: *Monoclonal antibodies toward scallop testis and wheat germ calmodulins.* *J Biochem* 109:551-558, 1991
13. Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* *Nature* 227:680-685, 1970
14. Leber SM, Sanes JR: *Lineage analysis with a recombinant retrovirus: application to chick spinal motor neurons.* [Review] *Advances in Neurology* 56:27-36, 1991
15. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG: *CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein.* *Cell* 60: 585-595, 1990
16. Levi G: *Neurobiological aspects of glial cells: astrocyte subtypes and the O-2A glial cell lineage.* *Ital J Neurol Sci* 13 (9 Suppl 14):9-16, 1992
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Fan AL, Randall RT: *Protein measurement with the Folin phenol reagents.* *J Biol Chem* 193: 265-275 1951
18. McKay RD, Hockfield SJ: *Monoclonal antibodies distinguish antigenically discrete neuronal types in the vertebrate central nervous system.* *Proc Natl Acad Sci* 79:6747-6751, 1982
19. McCarthy KD, de Vellis J: *Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue.* *J Cell Biol* 85:890-902, 1980
20. Miller RH, Raff MC: *Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct.* *J Neurosci* 4:585-592, 1984
21. Morrison RS, de Vellis J: *Growth of purified astrocytes in a chemically defined medium.* *Proc Natl Acad Sci* 78 (11):7205-7209, 1981
22. Needels DL, Nieto-sampedro M, Cotman CW: *Induction of a neurite promoting factor in rat brain following injury or differentiation.* *Neurosci* 18:517-526, 1986
23. Perentes E, Rubinstein LJ: *Recent applications of immunoperoxidase histochemistry in human neuro-oncology.* *Arch Pathol Lab Med* 111:796-812, 1987
24. Pettmann B, Weibel M, Sensenbrenner M: *Purification of two astroglial growth factors from bovine brain.* *FEBS Lett* 189: 102-108, 1985
25. Raff MC, Miller RH, Noble M: *A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium.* *Nature* 303:390-396, 1983
26. Rakic P: *Glial cells in development.* In vivo and in vitro approaches. [Review] *Ann New York Acad Sci* 633:96-99, 1991
27. Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RDG: *Region specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 implantation into the developing mammalian brain.* *Cell* 66:713-729, 1991
28. Reynolds BA, Weiss S: *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.* *Science* 255:1707-1710, 1992
29. Rohyana T, Rorke LB, McKay RD: *Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells.* *Lab Invest* 66 (3):303-313, 1992
30. Saneto RP, de Vellis J: *Characterization of cultured rat oligodendrocytes proliferating in a serum free, chemically defined medium.* *Proc Natl Acad Sci* 82 (5):3509-3513, 1985
31. Suslov ON, Kukekpv VG, Laywell ED, Scheffler B, Steindler DA: *RT-PCR amplification of mRNA from single brain neurospheres.* *J Neuro Meth* 96 (1):57-61, 2000
32. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.* *Proc Natl Acad Sci* 78:4350-4356, 1979
33. Veh RW, Meyer KH, Behringer DM, Schatz CR, Petrasch E, Andres KH: *Antibodies against neuroactive amino acids and neuropeptides. Combination of acetylcholinesterase cytochemistry with immunocytochemical double staining techniques for the demonstration of GABA and glutamate like immunoreactivities in thalamus, hippocampus, cerebellar and cerebral cortex of the rat.* *Acta Histochem-Suppl* 37:189-190, 1989
34. Williams BP: *Precursor cell types in the germinal zone of the cerebral cortex.* [Review] *Bioessays* 17 (5):391-393, 1995
35. Yeon DS, von Visger J, Oh TH, Markelonis GJ: *Differentiation of EGF responsive stem cells from newborn rat forebrain in culture.* *Soc Neurosci Abst* 370-4, 1993
36. Yeon DS, von Visger J, Oh TH, Markelonis GJ: *Proliferation and differentiation of neuroepithelial progenitor cells from newborn rat forebrains.* *J Exp Neurol* In press, 1994